

**METHOD FOR THE SIMULTANEOUS AMPLIFICATION OF MULTIPLE SEQUENCES IN A PCR RE MARKING THEREOF****Publication number:** DE10065814**A****Publication date:** 2002-07-11**Inventor:** BERLIN KURT (DE); OLEK ALEXANDER (DE); DISTLER JUERGEN (DE)**Applicant:** EPIGENOMICS AG (DE)**Classification:****- international:** C12Q1/68; C12Q1/68; (IPC1-7): C12Q1/68**- European:** C12Q1/68D4**Application number:** DE20001065814 20001222**Priority number(s):** DE20001065814 20001222**Ref****Abstract of DE10065814**

A method for the amplification of nucleic acids is disclosed, whereby the section for amplification is first hybridised with at least two primer o two domains, of which the sequence-specific domain at the 3' terminus on the section to be amplified is hybridised and the generic domain : hybridised. Then an amplification reaction is carried out using a polymerase, a marked primer oligonucleotide is hybridised on the obtained : which binds to the generic domain of the first primer. In the final step the sequence of the amplification product is checked.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑯ Offenlegungsschrift  
⑯ DE 100 65 814 A 1

⑯ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
C 12 Q 1/68

⑯ Aktenzeichen: 100 65 814.8  
⑯ Anmeldetag: 22. 12. 2000  
⑯ Offenlegungstag: 11. 7. 2002

<p>⑯ Anmelder: Epigenomics AG, 10435 Berlin, DE</p> <p>⑯ Vertreter: Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 10178 Berlin</p>	<p>⑯ Erfinder: Berlin, Kurt, Dr., 14532 Stahnsdorf, DE; Olek, Alexander, 10115 Berlin, DE; Distler, Jürgen, 10825 Berlin, DE</p> <p>⑯ Entgegenhaltungen: US 58 82 856 A US 57 44 306 A</p> <p>A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi Syndrome based on allelic methylation difference at the SNRPN Locus. ZESCHNIGK, M. u.a., Eur. J. Hum. Genet. (1997)5, 94-98;</p>
--	--

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren für die simultane Amplifikation vieler Sequenzen in einer PCR-Reaktion und deren Markierung

⑯ Beschrieben wird ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, bei dem man zuerst die zu amplifizierenden Abschnitte mit mindestens zwei Primeroligonukleotiden hybridisiert, welche zwei Domänen aufweisen, von denen die am 3'-Ende befindliche, sequenzspezifische Domäne an den zu amplifizierenden Abschnitt hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche, generische Domäne nicht hybridisiert. Anschließend wird eine Amplifikationsreaktion mittels einer Polymerase durchgeführt und nachfolgend an die entstandenen Amplifikate ein markiertes Primeroligonukleotid hybridisiert, welches an die generische Domäne der ersten Primer bindet. Im letzten Schritt wird das Amplifikat hinsichtlich seiner Sequenz untersucht.

## Beschreibung

## Gebiet der Erfindung

- 5 [0001] Die Erfindung bezieht sich auf die besonders rationelle Herstellung komplexer, markierter Amplifikate in einer PCR-Reaktion. Diese Amplifikate können nachfolgend hinsichtlich ihrer Sequenz mittels verschiedenster Methoden untersucht werden. Besonders ist das Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungsmustern in DNA-Proben geeignet.

## Stand der Technik

10

[0002] Die Polymerasenkettreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der im Prinzip jede DNA selektiv amplifiziert werden kann. Diese Methode beinhaltet den Gebrauch eines Satzes von meist zwei Oligonukleotiden mit vorbestimmter Sequenz, den sogenannten Primern, die an zu ihnen komplementäre DNA Strände hybridisieren und die Grenzen für die zu amplifizierende Sequenz definieren.

15

[0003] Die Oligonukleotide initiieren die DNA Synthese, die durch eine thermostabile DNA Polymerase katalysiert wird. Jede Runde der Synthese wird typischerweise durch einen Schmelz- und Reannelierungsschritt getrennt. Dies erlaubt es, eine gegebene DNA Sequenz mehrere hundert Male in weniger als einer Stunde zu amplifizieren.

[0004] Durch die Einfachheit und Reproduzierbarkeit dieser Reaktionen hat die PCR eine weite Akzeptanz erreicht. Zum Beispiel wird die PCR für die Diagnose ererbter Fehlfunktionen und bei Verdacht auf Erkrankungen verwendet.

20

[0005] Oft wird jedoch auch eine Amplifikation einer gegebenen Probe durchgeführt, einfach um das Material für eine nachfolgende Untersuchung zu vermehren. Die zu untersuchende Probe wird in diesem Fall zunächst amplifiziert, entweder ausgehend von genetischer DNA, oder z. B. isolierter mRNA. Meist ist es erforderlich, mindestens einen der Primer zu markieren, z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff, um das Fragment in nachfolgenden Experimenten identifizieren zu können.

25

[0006] Eine besonders einfache und kostengünstige Variante zum Anbringen einer Markierung an die Amplifikate stellt die Methode dar, Primer zu verwenden, die zwei Domänen haben. Die eine hybridisiert spezifisch an die zu amplifizierende Region, während die andere nur die Funktion hat, mit einem markierten Oligonukleotid zu hybridisieren. Dieses Oligonukleotid kann für verschiedenste Amplifikationen immer das gleiche sein, wenn immer die gleiche für die Markierung zuständige Domäne des Primers verwendet wird. Insbesondere bei teuren Markierungen ist dies eine kostengünstige Lösung. Beispielsweise werden für diese Reaktion drei verschiedene Oligonukleotide eingesetzt, ein sequenzspezifischer Vorwärtsprimer mit M13(-21) Schwanz, ein sequenzspezifischer reverser Primer und ein universelles fluoreszenzmarkiertes M13(-21) Oligonukleotid (Schuelke et al., An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments 2: 18, 2000), welches an den M13(-21) Schwanz des Vorwärtsprimers bindet.

30

[0007] Diese amplifizierte DNA wird für die Identifikation von Mutationen und Polymorphismen benutzt. Als analytische Methode dafür kommt z. B. die Primer Extension Reaktion, Sequenzierung nach Sanger oder z. B. Restriktionsverdau und nachfolgende Untersuchung auf z. B. Agarosegelen in Frage.

[0008] Zur Untersuchung der DNA wird über die Untersuchung der Basensequenz hinaus häufig das Verhältnis von den DNA-Basen Cytosin zu 5-Methylcytosin herangezogen, bzw. es werden einzelne Cytosinpositionen auf Methylierung hin untersucht.

40

[0009] 5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

45

[0010] Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfat mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass

50

Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch "normale" molekulärbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und

55

Renaturierung der DNA (Bisulfat reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. Nucleic Acids Res. 1996 Dec 15; 24(24): 5064–6). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

60

[0011] Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein T, DePamphilis ML, Zorbas H. Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. Nucleic Acids Res. 1998 May 15; 26(10): 2255–64.

65

[0012] Die Bisulfat-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (Zeschnigk M, Lich C, Buiting K, Doerfler W, Horsthemke B. A single-tube PCR test for the diagnosis of Angelman and Prader-Willi syndrome based on allelic methylation differences at the SNRPN locus. Eur J Hum Genet. 1997 Mar–Apr; 5(2): 94–8) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfat-Behandlung amplifiziert und

entweder komplett sequenziert (Olek A, Walter J. The preimplantation ontogeny of the H19 methylation imprint. *Nat Genet.* 1997 Nov; 17(3): 275–6) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine "Primer-Extension-Reaktion" (Gonzalgo ML, Jones PA. Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension (Ms-SNuPE). *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15; 25(12): 2529–31, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.* 1997 Jun 15; 25(12): 2532–4) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO 99 28498).

5

[0013] Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind:

10

Grigg G, Clark S. Sequencing 5-methylcytosine residues in genomic DNA. *Bioessays.* 1994 Jun; 16(6): 431–6, 431; Zebschnigk M, Schmitz B, Dittrich B, Buiting K, Horsthemke B, Doerfler W. Imprinted segments in the human genome: different DNA methylation patterns in the Prader-Willi/Angelman syndrome region as determined by the genomic sequencing method. *Hum Mol Genet.* 1997 Mar; 6(3): 387–95; Feil R, Charlton J, Bird AP, Walter J, Reik W. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res.* 1994 Feb 25; 22(4): 695–6; Martin V, Ribieras S, Song-Wang X, Rio MC, Dante R. Genomic sequencing indicates a correlation between DNA hypomethylation in the 5' region of the pS2 gene and its expression in human breast cancer cell lines. *Gene.* 1995 May 19; 157(1–2): 261–4; WO 97 46705, WO 95 15373 und WO 45560.

15

[0014] Zur Analyse der PCR-Produkte müssen diese z. B. mit einer Fluoreszenz-Markierung oder radioaktiven Markierung versehen werden. Diese Markierungen können entweder an den Primern oder an den Nukleotiden angebracht werden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-Ende der jeweiligen Primer. Ferner kommen als Fluoreszenzfarbstoffe 6-Carboxyfluoreszin (FAM), Hexachlor-6-carboxyfluoreszin (HEX), 6-Carboxy-x-rhodamin (ROX) oder Tetrachlor-6-carboxyfluoreszin (TET) in Frage. Diese Farbstoffe sind jedoch vergleichsweise teuer.

20

[0015] Für die Analyse von Genen, wo das mutierte Allel oder der Polymorphismus gut charakterisiert sind, ist die Amplifikation von einzelnen definierten Regionen der DNA manchmal ausreichend. Wenn man jedoch undefinierte Gene analysiert, sind meistens eine Vielzahl von PCR Reaktionen notwendig, um kritische Deletionen oder Änderungen von Basen zu identifizieren. Noch komplizierter ist die Etablierung einer Multiplex-PCR, bei der ein Forwardprimer und eine Vielzahl von Reversprimern verwendet werden, um definierte Genabschnitte zu amplifizieren.

25

[0016] Während die Annelierungstemperatur und die Primerkonzentration bis zu einem gewissen Grad berechnet werden können, müssen die Bedingungen für jede einzelne Multiplexreaktion im allgemeinen experimentell bestimmt werden. Da die Wahrscheinlichkeit einer nichtspezifischen Initialreaktion mit jedem zusätzlichen Primer ansteigt, müssen die Bedingungen bei weiterer Primerzugabe meistens modifiziert werden. Des weiteren vermehren sich Artefakte, die durch die Konkurrenz um Ressourcen entstehen, z. B. um die Primer bei der Multiplex-PCR. Dies liegt daran, dass die Ausbeuten von ungleich amplifizierten Fragmenten mit jedem Zyklus ansteigen.

30

[0017] Durch die angesprochenen Schwierigkeiten kann die Entwicklung eines neuen diagnostischen Tests sehr arbeits- und kostenintensiv sein.

35

[0018] Weighardt et al. (PCR Methods and App. 3: 77, 1993) beschreiben den Gebrauch von 5'-verlängerten Oligonukleotiden für die PCR. Diese Amplifikationsmethode beinhaltet als charakteristisches Merkmal die separate Annelierung und Primer Verlängerungsreaktion für jeden individuellen Primer, was in einem Multiplex-Kontext nicht durchführbar ist.

40

[0019] Wie gezeigt, ist es gegenwärtig Stand der Technik, zur Identifizierung von Cytosin-Methylierung die Proben-DNA mit Bisulfit zu behandeln und nachfolgend einfache Amplifikationen durchzuführen. Es fehlt jedoch ein Verfahren, dass es erlaubt, unter Verwendung von Primer mit zwei Domänen eine besonders spezifische zwei-Stufen-Amplifikation durchzuführen, die besonders spezifisch eine Vielzahl von Fragmenten gleichzeitig bereitstellt und die zugleich das Problem löst, dass normalerweise eine Vielzahl von markierten und entsprechend teuren Primern für eine solche komplexe Amplifikation eingesetzt werden muss.

45

### Aufgabenstellung

[0020] Es soll ein Verfahren bereitgestellt werden, welches die Nachteile des Standes der Technik überwindet. Es soll zum einen eine sehr spezifische 2 Stufen PCR mit hoher Multiplexierbarkeit bereitstellen, die zugleich das Problem der kostenintensiven Markierungen löst. Das Verfahren soll sich insbesondere zum Nachweis von Cytosinmethylierung in DNA-Proben eignen.

50

### Beschreibung

55

[0021] Beschrieben wird ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren.

[0022] Die Nukleinsäuren werden besonders bevorzugt aus einer genomischen DNA-Frobe erhalten, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen.

60

[0023] Die Nukleinsäureprobe wird zu Beginn besonders bevorzugt in Agarose eingebettet und mit einer Bisulfatlösung (= Disulfat, Hydrogensulfat) umgesetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt. Bei dieser chemischen Behandlung ist ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger vorhanden.

65

[0024] Da im humanen Genom lediglich ca. 3% der Cytosinbasen methyliert vorliegen, enthält Bisulfat-behandelte DNA zum größten Teil die Basen A, G, T und U; das heißt bezüglich ihres Basenpaarungsverhaltens lediglich 3 Basen (A, G und T), da U und T das gleiche Paarungsverhalten zeigen.

- [0025] Dann werden die zu amplifizierenden Abschnitte mit mindestens zwei Primeroligonukleotiden hybridisiert, welche zwei Domänen aufweisen, von denen die am 3'-Ende befindliche, sequenzspezifische Domäne an den zu amplifizierenden Abschnitt hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche, generische Domäne nicht hybridisiert. Im nächsten Schritt wird eine erste Amplifikationsreaktion mittels einer Polymerase durchgeführt. In einem weiteren Schritt wird an die Amplifikate ein markiertes Primeroligonukleotid hybridisiert, welches an die generische Domäne der ersten Primer hybridisiert. Bevorzugt wird darauf eine zweite Amplifikation mit einer Polymerasereaktion durchgeführt.

5 [0026] Für die Amplifikation wird besonders bevorzugt eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet.

[0027] Wird Bisulfit-behandelte DNA amplifiziert, führt dies dann zu DNA-Fragmenten, die sich dadurch auszeichnen, dass der (+)-Strang die Basenzusammensetzung A, T und G, sein revers-komplementärer (-)-Strang die Zusammensetzung A, T und C besitzt. Daraus ergibt sich, dass im (+)- oder (-)-Strang nie oder selten die C und G Nukleobasen gleichzeitig vorhanden sind. Durch diese Eigenschaft von Bisulfit-behandelter DNA und seinen Amplifikationsprodukten ist es möglich Primer herzustellen, die mit Bisulfit Templat-DNA keine unspezifischen PCR-Produkte ergeben und so als generell anwendbare Markierungssoligonukleotide bzw. Detektionssonden für PCR-Amplifikate von Bisulfit-behandelter DNA verwendet werden können.

10 [0028] Voraussetzung hierfür ist, dass für die Amplifikation von Bisulfit-behandelter DNA genspezifische Primer des Typs 1 und 2 entworfen werden, die neben einer Gen-spezifischen Domäne eine generische Domäne besitzen. Diese generische Primerdomäne ermöglicht die Markierung der DNA-Fragmente mit den generell anwendbaren Markierungssoligonukleotiden (Typ M1 und Typ M2) bzw. ihre Detektion mit den generellen Markierungssoligonukleotiden (Typ M1 und Typ M2) durch Hybridisierungsverfahren. Für die Amplifikation spezifischer Gene oder mehrerer Gene in einer Multiplex-PCR sind mindestens 2 Primer notwendig, ein Primer des Typs 1 und der zweite vom Typ 2 (siehe unten). Mit diesen Primern werden die entsprechenden DNA-Fragmente amplifiziert.

15

20

## Aufbau und Eigenschaften der Primer

25 Primer Typ1

<i>generische Domäne</i>	<i>genspezifische Domäne</i>
5'	3'
<sup>30</sup> enthält A, T, C, G	enthält A, T, G

## Primer Typ2

## Primer TypM1

45 Sequenz identisch mit generischer Domäne des Typ1 Primers

Mod-5 ----- 31

enthält A,T,C,G, Mod: Modifikation oder Markierung

50

## Primer TypM2

Sequenz identisch mit reverskomplimentärer Sequenz der generischen Domäne des Typ2 Primers

55 Mod- 5 -

enthält A.T.C.C. Mod.: Modifikationen und Veränderungen

60 [0029] Bevorzugt enthält die generische Domäne der Primer des Typs 1 und 2 eine Sequenz, die aus A, C, G und T zu-

[0030] Die genspezifischen Domänen sind, wie der Name schon sagt, spezifisch für ein oder mehrere Genfragmente. Im Fall der sequenzspezifischen Primer vom Typ 1 ist die Sequenz aus A, T und G Basen, im Fall der sequenzspezifischen Primer des Typs 2 aus A, T und C Basen zusammengesetzt.

[0031] In einer zweiten PCR-Reaktion mit einem generischen Primerpaar des Typs M1 und M2 werden diese Gens oder eine beliebige Anzahl von Genen, die aus PCR-Reaktionen mit Primerpaaren (Typ 1 und Typ 2) hervorgegangen sind, gleichzeitig reamplifiziert, wobei alle Primer des Typs 1 und die Primer des Typs 2 identische generische Domänen besitzen (Beispiel 2 und 3). Die generischen Domänen der Primer des Typs 1 und 2 sind so entworfen, das die entspre-

chenden generischen Markierungsprimer (Typ M1 und Typ M2) mit der verwendeten Bisulfit Templat-DNA möglichst keine unspezifischen PCR-Produkte in eine PCR-Reaktion erzeugen. Die PCR-Reaktionen können sequentiell oder durch die geeignete Auswahl der Genspezifischen und generischen Primer, sowie die Durchführung der PCR, simultan in einer sogenannten Eintopf-Reaktion durchgeführt werden.

[0032] Generische Primer des Typs M1 und M2 können auch für die Detektion von PCR-Amplifikaten, die mit Primern des Typs 1 und Typs 2 erzeugt und z. B. auf DNA-Arrays, Nitrocellulose-, PVDF-Membranen oder anderen festen Oberflächen immobilisiert wurden, durch Hybridisierungsverfahren verwendet werden. 5

[0033] Die amplifizierten Abschnitte, die aus PCR-Fragmenten mit zwei Domänen aufweisenden Primern hervorgegangen sind, können auf Festphasen immobilisiert werden. Dies geschieht durch chemische Reaktionen (z. B. durch die Einführung einer 5'-Aminofunktion) oder durch Hybridisierung an andere auf die Festphase immobilisierte Oligonukleotide. Die Amplifikate können dabei die durch die markierten generischen Primer des Typs M1/M2 detektiert werden. Bevorzugt sind die an den Amplifikaten angebrachten Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar. 10

[0034] Werden als generische Primer keine DNA-Oligomere jedoch PNA-Oligomere des Typs M1 und M22 verwendet, können PCR-Amplifikaten, die mit Primern des Typs 1 und Typs 2 erzeugt wurden, auch im MALDI-TOF identifiziert und quantifiziert werden. 15

[0035] Bei den Markierungen der Oligonukleotidprimer handelt es sich vorzugsweise um Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichem Emissionsspektrum (z. B. Cy3, Cy5, FAM, HEX, TET oder ROX) oder um Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen im Falle von Energietransfer-Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern. Die Markierungen können bevorzugt Radionuklide oder bevorzugt ablösbare Massenmarkierungen sein, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Vorzugsweise können auch zur Markierung Moleküle verwendet werden, die erst in einer weiteren chemischen Reaktion ein Signal erzeugen. Bevorzugt sind die zur Markierung verwendeten Moleküle an definierten Stellen an eine Festphase gebunden, um über eine Festphasen-PCR die PCR-Produkte zu immobilisieren, die aus einer PCR-Reaktion und Domäneprimern hervorgegangen sind. 20

[0036] Die PCR-Fragmente sind vorzugsweise auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet. 25

[0037] Abschließend wird das Amplifikat hinsichtlich seiner Sequenz untersucht.

[0038] Die beschriebene DNA-Modifizierung erfolgt durch den Einsatz von identischen Primerpaaren mit einer gleichen fragmentspezifischen Modifizierung, das heißt das alle Markierungen identisch sind und die gleiche spezifische Reaktion ergeben. Durch diese Vereinfachungen können beträchtliche Kosten eingespart werden, da insbesondere die Farbstoff- oder Massenmarkierungen große Kosten verursachen. 30

[0039] Das Verfahren wird vorzugsweise verwendet zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressions-symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. 35

[0040] Das Verfahren wird besonders bevorzugt verwendet zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung. 40

[0041] Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

45

### Beispiel 1

#### Design und Aufbau genspezifischer und modularer Primer

[0042] Von den Genen OAT (ACCESSION ep30056) und MDR1 (ACCESSION X58723) wurden jeweils die nach einer Bisulfitbehandlung vorliegenden Sequenzen ermittelt. Basierend auf diesen chemisch vorbehandelten DNA-Sequenzen (siehe Anhang) wurden die folgenden genspezifischen Primer-Domänen hergestellt und mit kommerziell erhältlicher Analysesoftware untersucht, um die selbstkomplementären bzw. inter-komplementären Sequenzbereiche in den Primersequenzen auszuschließen (siehe Tab 1 und 2). Diese Sequenzen wurden in nicht-modulare PCR-Primer OAT-fp, OAT-rp, MDR-fp und MDR-rp umgesetzt und in PCR-Reaktionen auf ihre Funktion getestet. Die Primerkombinationen für OAT und MDR1 lieferten bei ihrer Verwendung in PCR-Reaktionen (vgl. Beispiel 2) mit Bisulfit DNA, hergestellt nach publizierter Methode (Olek et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064–5066), die erwarteten Produkte von 479 nt und 633 nt (siehe Tab 1). Als Sequenz für die generischen Primer-Domäne wurden gen1-f, entsprechend der Sequenz des M13 universal. Sequenzierprimers und gen2-f (Tab 2), sowie gen-r entsprechend des reversen M13 Sequenzierprimers ausgewählt. Die entsprechenden, auf diesen Sequenzen basierenden nicht-modularen Primer, zeigten in PCR-Reaktion auf Bisulfit DNA, unter verschiedenen Reaktionsbedingungen, in den Primerpaarkombinationen gen1-fp, gen-rp, sowie gen2-fp, gen-rp, keine erkennbare PCR-Produkte. 50

[0043] Die modularen Primer zur Amplifikation von OAT und MDR1-Genbereichen ergeben sich durch die Fusion der generischen Sequenzen mit den entsprechenden genspezifischen Domänen, um die modularen Primer, OAT-f1mp, OAT-f2mp, OAT-rmp, MDR-f1mp, MDR-f2mp und MDR-rmp zu erhalten (Tab 3). 55

60

65

# DE 100 65 814 A 1

Tab 1. Genspezifische und generische Primerdomäne

Gen	Vorwärts-primer	Revers-primer	PCR-Fragment
5 OAT	OAT-f	OAT-r	479 nt
10 MDR1	MDR-f	MDR-r	633 nt
15 generisch	gen1-f gen2-f	gen-r	

Tab 2. Nicht-modulare Primersequenzen

20 OAT-fp	TTGGAGGTGGATTAGAGGTATAATTAA
OAT-rp	AAACRTCACTACAACCTAAAAACTAA
25 MDR-fp	TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG
30 MDR-rp	TAAAAACTATCCCATAATAACTCCAAC
35 gen1-fp	GTAAAACGACGCCAGT
gen2-rp	GTAAAACCAGGCCAGT
gen-rp	CAGGAAACAGCTATGAC
40 gen1-fp5	Cy5-GTAAAACGACGCCAGT
gen2-rp5	Cy5-GTAAAACCAGGCCAGT
45 gen-rp5	Cy5-CAGGAAACAGCTATGAC

Tab 3. Modulare Primer

50 Name	Sequenz	
Domäne	generische Domäne	-
55 OAT-f1mp	GTAAAACGACGCCAGT-TTGGAGGTGGATTAGAGGTATAATTAA	genspezifische

60

65

OAT-f2mp            GTAAAACCAGGCCAGT-TGGAGGTGGATTAGAGGTATAATTAA  
 OAT-rmp            CAGGAAACAGCTATGAC-AAACRTCACTACAACCTAAAAACTAA

5

MDR-f1mp            GTAAAACGACGCCAGT-TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG  
 MDR-f2mp            GTAAAACCAGGCCAGT-TAAGTATGTTGAAGAAAGATTATTGTAG  
 MDR-rmp            CAGGAAACAGCTATGAC-TAAAAACTATCCCATAATAACTCCCAAC

10

15

## Beispiel 2

## Gen-spezifische Amplifikation von OAT und MDR1 mit modularen Primern

[0044] Die Amplifikation von OAT- und MDR1-Genbereichen erfolgte mit Qiagen Hotstart-Polymerase entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl.

20

## Reaktionsansatz (allgemein)

25

Bisulphit-DNA (10 ng)	1 µl
Reaktions-Puffer 10x (Qiagen, Hilden)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM each)	2 µl
Primer1 6,25 pmol	2 µl
Primer2 6,25 pmol	2 µl
Polymerase (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,5 µl
Wasser	11,5 µl

30

[0045] Die PCR-Reaktion wurde im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgendem Programm durchgeführt.

35

## Programm

40

15 min 96 °C

60 s 96 °C

30 s 56-60 °C

45 s 72 °C

x 40

45

10 min 72 °C

50

[0046] In Tab 4 sind die verwendeten Primerkombinationen und Annealing-Temperaturen für die Amplifikation von QAT und MDR1 zusammengefaßt. Die erzeugten PCR-Amplikate wurden durch Agarosegel-Elektrophorese (1,5% Agarose in 0,5 × TBE-Puffer, Manniatis et al.) analysiert. Hierfür wurden 4 µl des PCR-Ansatzes der Gelelektrophorese unterzogen, das Ergebnis ist in Abb 1 dargestellt.

55

60

65

Tab. 4 PCR-Primerkombinationen

Gen	Primer 1	Primer 2	Annealing Temp.	Spur in Abb 1
5 OAT	OAT-f1mp	OAT-rmp	55,6 °C	A
10 OAT	OAT-f2mp	OAT-rmp	55,6 °C	B
MDR1	MDR-f1mp	MDR-rmp	59 °C	C
15 MDR1	MDR-f2mp	MDR-rmp	59 °C	D

## Beispiel 3

15 Reamplifikation von OAT und MDR1 mit generischen Primern

20 [0047] Für die Reamplifikation (= Markierungsamplifikation) von OAT- und MDR1-Genbereichen erfolgte mit Qiagen Hotstart-Polymerase entsprechend der Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Hierbei wurden die PCR-Produkte aus der Genspezifischen PCR (siehe Beispiel 2, Abb 1) 1 : 1000 verdünnt und getrennt oder gemeinsam in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Als Primer wurden die am 3'-Ende mit dem Floureszenzfarbstoff, Cy5, modifizierte Primerpaare gen1-fp5 und gen-rp5, sowie gen2-fp5 und gen-rp5 verwendet: Die Ergebnisse dieser Markierungsamplifikation sind in Abb. 2 dargestellt.

## 25 Reaktionsansatz (allgemein)

Templat-DNA	1 µl
Reaktionspuffer 14x (Qiagen, Hilden)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM each)	2 µl
30 Primerpaar (6,25 pmol je Primer)	4 µl
Polymerase (Qiagen, Hilden) (0,5 U)	0,5 µl
Wasser	11,5 µl

35 [0048] Die PCR-Reaktion wurde im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgendem Program durchgeführt:

15 min 96 °C

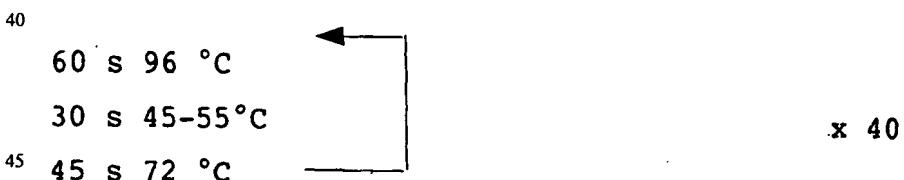


Fig. 2

Reamplifikation von OAT/Mdr1-Fragmenten aus Beispiel 2 mit generischen Primer

[0051] M Größenmarker, A, MDR1 mit Primer gen1-fp5 und gen-rp; B, OAT mit Primer gen1-fp5 und gen-rp; C, 5  
MDR1 und OAT mit Primer gen1-fp5 und gen-rp; D, MDR1 und OAT mit Primer gen2-fp5 und gen-rp.

## Anhang

## Sequenzen von OAT und MDR1 nach der Behandlung mit Bisulfit

10

## Mdr1

0	GTTAAGAATA AAATATATTA AGATAAGGAA AATTTGTAGT TAAGAATAGA AAAAAATTAT	
60	GGTTTGAAAG TATGAGTTAT TTAAAGAAAG TGAAATATT TTTAGATTAT GTAGTAAAAA	15
120	ATAAAAGTGTAT TTTTTTTTTT TAAATTTATG TAATAAATTG ATAGGTAAATA TGTGAAAGTT	
180	ATAGAATGTA GATTAGAGGA TATAATAAAT TTATTTTTTT TATGTTTATA AGAAGTAAGA	
240	AAAGTTTGAA TGTGAGTTAG TATTGTTTA TAATTTTGAA TTGTGTAGAT TGTACGTATT	20
300	TTTTTTAGT TTGAAGTAAA TAGTGGATAG GAAAAAATAT TAAATGTTGG TAGTAAATAT	
360	GGAAGGAAAT TATAATTAAAT GTAATATGTT AAAATATGTT ATGTTTATTT TATTAATTTG	25
420	AATTAAAATG TAAGAATTAA AAATGTTTG GAAAATACG GGTATTGATT TGACGTTGA	
480	AGTTTAAAAA TATTATATAT TTTGAAATAG TATTGTTATT TTGAAATATT TGTTTTATA	
540	TATTTTTAA AATTTTTTTT TTTTTTTATT TTATTTATTA TAAATAAAG GATGAATAGA	30
600	TGTAATTAG AAATTGTTAA GTATGTTGAA GAAAGATTAT TGTAGAAAAA TTTTTTTAG	
660	TTTTTTAA GGTGTTAGGA ACTAGAAAGG TGATATAGAA TTGGAGAGGT CGGAGTTTT	
720	GTATTAATTG TATTAATGC GAATTCGAG AAAATTTTTT TTAATTACGT TTTGTAGTTA	35
780	TATGGATATG AAGATTATG TGAATTTGA AAGACGTGTT TATATAAGTT GAAATGTTTT	
840	TAATGATTTA GTTGATGCGC GTTTTTTAT TTGTTTTTT TAGAGAGGTG TAACGGAAGT	
900	TAGAATATTT TTTTGAAA TTTAATTGTT TTCGTAGTTT TTGAGGAAT TAGTATTAG	40
960	TTAATTCCGG TCAGGAGTAG TTATTTGTGG TGAGGTTGAT TGGTTGGTA GGAATAGCGT	
1020	CGGGGCGTGG GTTGAGTATA GTCGTTCGT TTTTTTGTT ATAGGAAGTT TGAGTTTATT	
1080	CGAGTAGCCG TTTTTTAAG TTTAAGAAG TAGAGGTCGT TGTCGTTTT TTTTAGTTT	45
1140	TTTTATTAAA GTCGGAGTAT TTTTTTTAA AATTTACGT TTTGGTGGTC GTTTAAAGGA	
1200	GCGCGAGGTA GGGGTACGTA AAGTTGGAG TTATATCGG ATAGTTTTA AGTGTAGGT	
1260	TTTTAGATTT TTGAAATTG GTTTTACGG GAGAAGGGTT TTTGAGGCG TGGATAGTGT	50
1320	GAAGTTTTT GGTAAGTTA TGGGGATTAA GTGGGTTAG ATTTAGATTT AGGAGTTTT	
1380	GGAGTAGCGT TTAAATCGTA GTGGTATTGG ATTATGTTGT TCGGAGCGCG TATACTCGC	
1440	GCGGTGCCGG GATTTGTTTT TTGAGTTCGC GGGCGTGGG TGGGAGGAAG TATCGTTCGC	55
1500	GGCGATTGGA ATCGGGAGGG AGAACGTTAT TGGCGCGGG TAAAGTTAG AACCGTTGT	
1560	TAGATTTTA ATTTGTTTT CGTGGAGATG TTGGAGATTT CGCGTATAAGG AAAGTTTTG	60
1620	TAGTGTGTTAT CGCGGTTAGA GTAGTTGGGG TATTAACGGC GGGCGTTTTT TTTTATTGTT	
1680	TTTTGGTTTC GACGGGGAT TAGAGGTTAG TTTTATTGTT AGCGCGTTG AGGTTATGTT	
1740	ATTTGGTTAA TGAGTTGCGG TTTTTTTTA GTGGGGATG GATTTGAAG GGGATCGTAA	
1800	TGGAGGAGTA AAGAAGAAGA ATTTTTTAA ATTGAATAAT AAAAGGTAAT TAGTTGTTT	65

1860 TATTTTATA GTTTATATAG TTGCGAGATT TGAGTAATT ATTGTTAGTT TTTAGTTTG  
 1920 AAATAAAATGA TATGTTGTTG TTTTAATTA TTTTAAGAA ACGTAAGTTA GTTTTGGAA  
 5 1980 TTAATATTTT TGTGTTAGACT AGAAGTTGT TGCGTTGAGTG GAGTATAGTA TATGTTTTT  
 2040 TTTGTTTTT TTTGTTTTT TTTTAATGA TATATAATAT TTTATATATT TATGAAATGG  
 2100 GGTATATGGA AGCGTTTTT ATATGTCGG AATGTGTAAT GATTAAGTTC GGGTATTTGA  
 10 2160 AGGATATATT ATTTAGGTA TATTTATTT TTATGTTG ATAATATTT AAGTTTTTA  
 2220 GTTATTTGA AATATATAAT ATATTGTTAA TTGTTAGTTAT TTTGTTGT TATCGAATAT  
 15 2280 TGGAATTTAT TTGTTTTATT TAATCGTTT TAGTTATTTA TTAATTTTT TTTATTTAT  
 2340 TTTTTATTT TTTTCGGTTT TTTTTTTTA GTTTGGTGT GTTTTTTTT TACTTTTTT  
 2400 GTTTTAGATA GGCGGATGTT TATATGTGTT TTTGTTTAT GAATTTTGT TTTTAAGTG  
 2460 GTGTTGGTCG TTTATACGTG AGTTATATGT TGTTGGTGAT TTGTTGTG GTTGTAGTT  
 20 2520 TTGTTTCGG TAAATGGTTA TGAAATATC GCGTTGTGG TTTGTTGAT GAGATAGAAG  
 2580 GTTAAAAGTA TATTTAGGTT GTTAATTGGT AATAAATATT TGTATATAAT ATTGGTAATG  
 2640 TAATTATATA GGGAAAATAA TTATTTAAAG TAAATTTGA TTATGGTGT TTGTTTTAT  
 2700 AGAATATTTA AAATTTTATT AAATAGATTT ATTGTTAGTA GTAAATTGTA AAATAGATTA  
 2760 GTAAGTTAA TAATATTAGA AATTGTAATG TAAATTATAA GATAAATTAG TTAAATATAT  
 30 2820 TAATATTATA AGAAATTAAG TTTTTAGTG TAAGAGAAA AATATAATG TGGAAATTAA  
 2880 ATATATTTT AAAAATAATG TTAAGTTGA ATTAGAAATT TTAATATGAA TT

35

## OAT

1 GGTAGCGACG ATTTTTGGAG GTGGATTTAG AGGTATAATT AAGTCGCCCG GCGTATTAGG  
 61 GTTTAAGGGT ATGGGGTTTT CGTAGTTGTG GTTGGGGTAG AGTTGGGGTT GTTTTTTTT  
 40 121 TTAGGAGTAT AGGCCGCCGT TTAGTTTAC GTTTTCGTT TTAGTTATA TTCGGGTCGC  
 181 GTAGTGGGG GTTTAATAGA TTTTTTTTT TCAGGGTTTA GTTTTTCGT TAGTAAGGGC  
 241 GGATAAGGAT TTTTTTCGTT TCGTTAGAGG AGGCGATCGA GGGGTTGAG TTTAGGTATA  
 301 GGTGGCCGGG TTTAGGAGGC GCGAGGCCGA TCGAATTCGC GGGAGGAGTA AAGATTTTG  
 361 ATGCGCGGTC GGAGGGCCGG GCGGAGGACG GGATTTACGC GATTGGTATT TTGTTTTCG  
 421 TTTTAGTTAA TGAGCGCCGA GGGTGTGTTG GGGGCGGGGT AGAATTAGTT TTAAAGTTGT  
 50 481 AGTGACGTTT CGGCCTTATT GTTGCCTTTT ATAGACGTCG CGTGTATTG GTTGTGTTA  
 541 GGCCTGTTA GGTATCGTTT GGGCGTCGTT GTTTGGGGT TTGGTTCGG GTTGTGTCGG  
 55 601 AACRTCACT ACAACTAAA AACTAA

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren, **dadurch gekennzeichnet**, dass die folgenden Schritte ausgeführt werden:
- 60 a) die zu amplifizierenden Abschnitte werden mit mindestens zwei Primeroligonukleotiden hybridisiert, welche zwei Domänen aufweisen, von denen die am 3'-Ende befindliche, sequenzspezifische Domäne an den zu amplifizierenden Abschnitt hybridisiert, während die am 5'-Ende befindliche, generische Domäne nicht hybridisiert,
- 65 b) es wird eine erste Amplifikationsreaktion mittels einer Polymerase durchgeführt,
- c) an die Amplifikate wird ein markiertes Primeroligonukleotid hybridisiert, welches an die generische Domäne der ersten Primer hybridisiert und
- d) das Amplifikat hinsichtlich seiner Sequenz untersucht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass nach Schritt c) des Anspruchs 1 zusätzlich eine zweite Amplifikation mit einer Polymerasereaktion erfolgt. 5
3. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass die generische Domäne der Primer die Nukleobasen A, C, G und T enthält, während die sequenzspezifische Domäne entweder nur die Basen A, T und C oder aber nur die Basen A, T und G enthält.
4. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man vor Schritt a) des Anspruchs 1 die Nukleinsäureprobe mit einem Reagenz chemisch umsetzt, wobei 5-Methylcytosin unverändert bleibt und Cytosin in Uracil oder eine andere im Basenpaarungsverhalten dem Uracil ähnliche Base umgewandelt wird. 10
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei dem Reagenz um ein Bisulfit (= Hydrogensulfat, Disulfat) handelt.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung nach Einbetten der DNA in Agarose erfolgt. 10
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass bei der chemischen Behandlung ein die DNA-Duplex denaturierendes Reagenz und/oder ein Radikalfänger zugegen ist. 15
8. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei den Markierungen der Oligonukleotidprimer um Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichem Emissionsspektrum (z. B. Cy3, Cy5, FAM, HEX, TET oder ROX) oder um Fluoreszenzfarbstoff-Kombinationen im Falle von Energietransfer-Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern handelt.
9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind. 20
10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbar Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Markierung Moleküle verwendet werden, die erst in einer weiteren chemischen Reaktion ein Signal erzeugen.
12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zur Markierung Moleküle verwendet werden, die an definierten Stellen an einer Festphase immobilisiert werden. 25
13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die PCR-Fragmente auf einer Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind. 30
15. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird.
16. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die Nukleinsäure aus einer genomischen DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfassen. 35
17. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion. 40
18. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung. 45

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

55

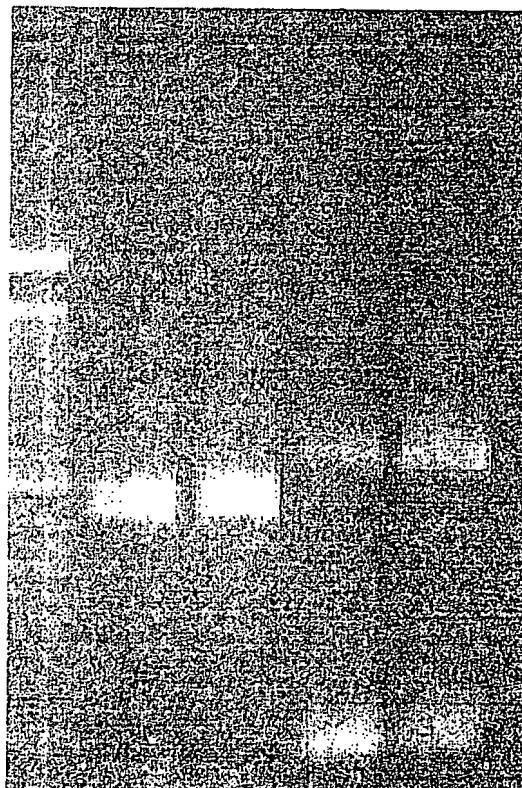
60

65

**- Leerseite -**

*Figur 1*

M A B C D



*Figur 2*

